

研究種目：若手研究(B)
 研究期間：2007～2008
 課題番号：19791280
 研究課題名（和文）脈絡膜血管新生におけるインターロイキン10発現動態の解明と治療への応用
 研究課題名（英文）Investigation into the role of Interleukin-10 in choroidal neovascularization and application to the treatment
 研究代表者
 平野 佳男 (HIRANO YOSHIO)
 名古屋市立大学・大学院医学研究科・助教
 研究者番号：40405163

研究成果の概要：

脈絡膜新生血管の発症機序は一般的な血管新生と同様に炎症や創傷治癒機転が関与しているとの報告が散見される。炎症やそれに続く血管新生はサイトカインのネットワークにより複雑に制御されている。インターロイキン10(IL-10)は抗炎症性サイトカインで、近年では抗血管新生因子・抗腫瘍作用を有すると報告されている。マウスを用いて実験的脈絡膜新生血管(CNV)を作成し、IL-10を硝子体内に投与することにより、CNVが抑制されるか検討した。雄のC57BL/6Jマウスにレーザー光凝固術を行い、CNVを作成した。その後、IL-10を硝子体内に投与し、1週間後に眼球摘出し、FITCで染色してフラットマウントを作成、CNVの面積を測定し対照と比較検討した。また経時的に眼球摘出し、網膜色素上皮-脈絡膜を分離してELISA法によりIL-10、血管内皮増殖因子(VEGF)の発現を測定し、マクロファージの集積をフローサイトメトリーで対照とIL-10投与群とで比較検討した。CNVの面積は、対照と比較しIL-10投与群(51.7±5.3%、P<0.001)で有意に減少した。同様にIL-10投与群は、VEGFの発現(56.5±12.5%、P<0.001)、マクロファージの集積(48.4±7.8%、P<0.001)で有意に減少したが、光凝固術後いずれの時期においても、IL-10の発現は非光凝固群と有意差は認められなかった。IL-10を硝子体内に投与することにより有意にCNVの発症を抑制することができた。機序としては、マクロファージの遊走能と活動性を抑制することによるものと考察した。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	700,000	0	700,000
2008年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
年度			
総計	1,400,000	210,000	1,610,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・眼科学

キーワード：脈絡膜新生血管・炎症

1. 研究開始当初の背景

脈絡膜新生血管の発症機序は一般的な血管新生と同様に炎症や創傷治癒機転が関与しているとの報告があり、白血球が重要な役割を担っていると考えられる。つまり、白血球の接着をコントロールすることで脈絡膜新生血管を抑制することができると考えられる。また炎症やそれに続く血管新生はサイトカインのネットワークにより複雑に制御されている。一般にインターロイキン(IL)-10は炎症に対して抑制的に作用すると考えられている。

2. 研究の目的

本研究ではIL-10に着目し、脈絡膜新生血管発症過程においてIL-10の発現動態を解明し、またIL-10でエンコードされたplasmid DNAを硝子体内に投与して脈絡膜新生血管発症が抑制されるか否かを検討し、加齢黄斑変性の予防薬として将来の臨床応用に結び付けることを目的とした。

3. 研究の方法

IL-10 ノックアウトマウスを用い実験的脈絡膜新生血管を作成し、脈絡膜新生血管の体積をワイルドタイプと比較検討する。

(1) C57BL/6J マウスおよびIL-10 ノックアウトマウスに対し脈絡膜新生血管を作成する。麻酔下で片眼にアルゴンレーザーで視神経乳頭から4乳頭径離れた網膜に4か所レーザーを照射する(50 μ m, 0.1秒, 200mW)。ブルッフ膜を破壊することで脈絡膜新生血管を作成する。

- (2) 治療群および対照群の新生血管体積を評価：1週間後に眼球を摘出し、固定、dehydration、rehydration 後、血管内皮細胞を染めるCD31 もしくはlectin で染色して、強膜 - 脈絡膜 - 色素上皮フラットマウントを作成してコンフォーカルマイクروسコープにより脈絡膜新生血管の体積を測定して比較検討する。
- (3) C57BL/6J マウスに対し、同条件で眼底にレーザーを25発照射して、1、2、3日後に眼球摘出して脈絡膜、網膜色素上皮を取り出し、RT-PCRによりIL-10の発現を経時的に測定する。

IL-10 plasmid DNA 含有リポソームにより遺伝子導入を試みる。

- (1) C57BL/6J マウスを用い、IL-10 plasmid DNA および対照としてempty plasmid DNA 含有リポソームを硝子体内投与して、網膜色素上皮細胞への遺伝子導入を試みる。
- (2) 麻酔下で片眼にアルゴンレーザーで網膜に25か所レーザーを照射する(50 μ m, 0.1秒, 200mW)。レーザー網膜光凝固を行うことにより網膜色素上皮に創傷をおこし、好中球あるいはマクロファージが最も多く遊走する時期(1日および3日)に屠殺後、眼球摘出する。
- (3) 網膜 - 網膜色素上皮 - 脈絡膜をホモジュナイドして、IL-10 およびVEGFの発現を正常眼と比較する。経時変化も検討する。
- (4) レーザー発症の脈絡膜新生血管を作成し、

遺伝子導入群と対照群とで脈絡膜新生血管の大きさを比較する。

4. 研究成果

マウスを用いて実験的脈絡膜新生血管(CNV)を作成し、IL-10 を硝子体内に投与することにより、CNV が抑制されるか検討した。雄のC57BL/6J マウスにレーザー光凝固術を行い、CNV を作成した。その後、IL-10 を硝子体内に投与し、1 週間後に眼球摘出し、FITC で染色してフラットマウントを作成、CNV の面積を測定し対照と比較検討した。また経時的に眼球摘出し、網膜色素上皮-脈絡膜を分離してELISA 法によりIL-10、血管内皮増殖因子(VEGF)の発現を測定し、マクロファージの集積をフローサイトメトリーで対照とIL-10 投与群とで比較検討した。CNV の面積は、対照と比較しIL-10 投与群(51.7 ± 5.3%、P<0.001)で有意に減少した。同様にIL-10 投与群は、VEGF の発現(56.5 ± 12.5%、P<0.001)、マクロファージの集積(48.4 ± 7.8%、P<0.001)で有意に減少したが、光凝固術後いずれの時期においても、IL-10 の発現は非光凝固群と有意差は認められなかった。IL-10 を硝子体内に投与することにより有意にCNV の発症を抑制することができた。機序としては、マクロファージの遊走能と活動性を抑制することによるものと考察した。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計5件)

① Sato R, Yasukawa T, Hirano Y, et al. Early-onset macular holes following ruptured retinal arterial

macroaneurysms. Graefes Arch Exp Ophthalmol. 246:1779-1782, 2008, 査読有.

② 吉村将典、平野佳男、他. トリアムシロン局所投与後の後囊下白内障の発症頻度. 日眼会誌. 112: 786-789, 2008. 査読有.

③ Inatani M, Iwao K, Kawaji T, Hirano Y, et al. Intraocular pressure elevation after injection of triamcinolone acetonide: a multicenter retrospective case-control study. Am J Ophthalmol. 145: 676-681, 2008, 査読有.

④ Hirano Y, et al. Comparative study on efficacy of a combination therapy of triamcinolone acetonide administration with and without vitrectomy for macular edema associated with branch retinal vein occlusion. Ophthalmic Res. 39: 207-212, 2007, 査読有.

⑤ 小原浩、平野佳男、他. 網膜下にシリコーンオイルが迷入したピット黄斑症候群の1例. 眼科臨床医報. 101: 909-912, 2007, 査読有.

[学会発表] (計6件)

① Ito A, Sakurai E, Hirano Y, et al. Effect of diabetes on the development of laser-induced choroidal neovascularization in mice. The Association for Research in Vision and Ophthalmology. 2008, April 27-May 1, Fort Lauderdale, Florida, USA.

② Hirahara S, Nozaki M, Ito A, Takase A, Hirano Y, et al. Selective laser trabeculoplasty for intraocular pressure elevation after triamcinolone

acetonide injection. The Association for Research in Vision and Ophthalmology. 2008, April 27-May 1, Fort Lauderdale, Florida, USA.

③ Ueda J, Hirano Y, et al. Evaluation of visual function and macular morphology before and after removal of idiopathic epiretinal membrane. The Association for Research in Vision and Ophthalmology. 2008, April 27-May 1, Fort Lauderdale, Florida, USA.

④ Hirano Y, et al. Suppression of ICAM-1 in murine retina by plasmid small interfering RNAs. The Association for Research in Vision and Ophthalmology. 2008, April 27-May 1, Fort Lauderdale, Florida, USA.

⑤ 平野佳男、他。
網膜へのsmall interfering RNA プラスミド導入によるICAM-1 の抑制. 日本糖尿病眼学会総会 2008, 3 月14-16日 (東京)

⑥ Sakurai E, Hirano Y, et al. Suppression of ICAM-1 in retinal and choroidal endothelial cells by hydrodynamics-based transfection of plasmid small interfering RNAs. Asia Annual Meeting of the Association for Research in Vision and Ophthalmology. 2007, March 2-5, Singapore.

[図書] (計0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計0 件)

○取得状況 (計0 件)

[その他]

なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

平野 佳男 (HIRANO YOSHIO)

名古屋市立大学・大学院医学研究科・助教

研究者番号: 40405163

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし